厚朴及澤瀉對於動脈粥狀硬化形成之研究

吳介信[1]　戴妏玲[1]　蔡輝彥[1]　謝明村[2]　張文正[3]

[1]中國醫藥學院　醫學系　藥理學科

[2]中國醫藥學院　中國藥學研究所

[3]中國醫藥學院　醫學系　生理學科

摘要

本計畫研究的目的主要在於探討中藥厚朴及澤瀉的抗粥狀動脈硬化作用。我們以含有 *1:1* 厚朴及澤瀉的的膽固醇飼料，餵食稱重約 *2-3* 公斤的紐西蘭白兔 *12* 週。實驗的結果顯示利用含有四種濃度的厚朴及澤瀉之混合飼料，除了最低濃度的 *0.1mg/kg* 未能明顯降低膽固醇含量外，其餘三種濃度的 *1mg/kg*， *10mg/kg* 和 *100mg/kg* 混合飼料皆明顯的降低血中之膽固醇含量。而粥狀動脈硬化的預防效果，則以餵食 *10mg/kg* 和 *100mg/kg* 的混合飼料較爲明顯。本實驗結果顯示厚朴和澤瀉對於改善粥狀動脈硬化有良好的預防作用，對於應用在人體抗粥狀動脈硬化的可行性，值得進一步探討。

關鍵詞：厚朴；澤瀉；粥狀動脈硬化

前言

粥狀動脈硬化的形成是導致心臟血管疾病的一個非常重要因子。粥狀動脈硬化形成的機轉，主要是由於暴露在高血脂環境下的血管內皮下細胞，因破壞性的刺激和癒合性的反應啓動泡沫細胞的過度堆積所引起的(1)。粥狀動脈硬化一般好發於血管的分枝和轉彎處，主要是因爲在這些部位由於血行動力的減緩而啓動了引起粥狀動脈硬化的訊號傳導路徑(2, 3, 4)。低密度脂蛋白(LDL)的血中含量是除了血行動力的因素外，形成粥狀動脈硬化的另一個非常重要的因子(5,6,7,8)。氧化的低密度脂蛋白會被巨噬細胞(macrophage)給吞噬而使得巨噬細胞轉變成泡沫細胞(foam cell)，逐漸累積在血管壁上的泡沫細胞最後就形成動脈粥瘤(atheroma)。在正常的情況下，低密度脂蛋白是不會被巨噬細胞給吞噬的，只有被氧化的低密度脂蛋白才會被吞噬。

臨床上用來預防或是改善粥狀動脈硬化的藥物或是效果不彰、或是副作用太大，尋找一個有效又安全的製劑是目前防治因粥狀動脈硬化所造成心血管疾病的一個重要研究方向。在傳統醫學上，中藥一直被認爲能有效且安全地調整體質，改善疾病。所以本計畫便朝中藥研發的方面著手，以降低粥狀動

連絡人:張文正

單位:中國醫藥學院 醫學系 生理學科

地址:台中市404學士路91號

電話:04-20053366 轉 5103　傳眞:04-2030133

脈硬化的形成。Honokiol和Magnolol是中藥厚朴*(Magnolia Officinalis)*的主要成份，研究報導曾指出他們對於降低心臟栓塞面積和改善心室性的心律不整都有相當好的成效(9，10)。在另一缺血再灌流的實驗中發現，因Honokiol和Magnolol所產生的抗心律不整作用會被Nitric Oxide (NO)的拮抗劑NO-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)給抑制住(11，12，13，14)，所以Honokiol和Magnolol的部份作用機轉應和NO的傳導路徑有某種程度的關聯。

在先前的實驗中，我們發現澤瀉*(Alismatis Rhizoma)*能有效的降低老鼠血中的總膽固醇和低密度脂蛋白的含量(15,16)，同時高密度脂蛋白的含量亦被明顯的提高。研究報告指出，體內的高膽固醇通常會增加低密度脂蛋白接受器的數量(17,18)，這可能是體內爲了要清除這些過量的膽固醇所作的代償性反應。本計畫便利用澤瀉降血脂的特性及厚朴抗氧化的作用，以評估這兩種中藥抽取物對於粥狀動脈硬化的預防效果。

材料與方法

一、建立粥狀動脈硬化的動物模型

六十隻紐西蘭純種白兔分別以含正常飼料，1%的膽固醇或是含有厚朴和澤瀉的混合飼料餵食12個禮拜。膽固醇飼料的製備如下：將10克的膽固醇溶解在含有50%乙醚的酒精中，以高壓氣體噴霧器將溶有膽固醇的乙醚噴灑在兔子飼料上，待酒精及乙醚揮發後，即可用來餵食兔子。澤瀉及厚朴的飼料製備亦是將其溶於含有50%乙醚的酒精中，連同膽固醇一同噴灑在飼料上。兔子共分成六組，每組有10隻兔子：對照組一的10隻兔子餵食正常飼料；對照組二的10隻兔子餵食含有1% cholesterol的飼料12週；實驗組一至四組分別餵食含有1:1之厚朴和澤瀉的1%膽固醇飼料，其藥物的濃度分別爲0.1mg/kg，1mg/kg，10mg/kg，100mg/kg等四種劑量。

二、兔子血中膽固醇含量的測定

兔子在餵食膽固醇飼料的過程中，每隔兩週自耳朵抽5ml的血液樣本以供膽固醇含量之測定。總脂蛋白內膽固醇含量測定法是依據膽固醇測試組合試劑所提供之方法(Sigma, St. Louis, USA)，藉膽固醇酯化酵素和膽固醇氧化酵素的作用將血中膽固醇代謝成Cholest-4-en-3-one+H2O2。而所產生的H2O2再和4-aminoantipyrine + p-hydroxybenzenesulfonate反應成quinoneimine。藉由在500nm 的波長下測其吸光值，再由已知濃度的標準檢品計算出回歸方程式，即可測得血中總脂蛋白內膽固醇之含量。

三、粥狀動脈硬化的定性分析

在12週的膽固醇飼料餵食後，將紐西蘭純種白兔以Pentobarbitol (50 mg/kg, Nembutal sodium, Abbott Laboratories, USA)麻醉後，以50毫升的注射針筒配合18號針頭，進行心臟直接穿刺取血，以做爲餵食過程中測量血中膽固醇含量的最後一個時間點。隨後將兔子腹部以縱剖方向切開，取出位於動脈弓至腸動脈間的主動脈，以生理食鹽水清洗血漬後並去除血管周圍的結締組織，隨即以Sudan IV的甲醇試液進行染色。將剝離乾淨的血管浸泡在含有2% Sudan IV的甲醇試液中十分鐘後，再以濃度逐漸降低的甲醇試液(100%，90%，80%，70%，60%)將背景顏色去染，有粥狀動脈硬化的部份將呈現紅色的反應。利用電腦掃瞄影像後，以Matrox Inspector (Matrox Electronic Systems Ltd., USA)之數位影像分析處理軟體來定量粥狀動脈硬塊的面積，藉此來評估藥物處理對於粥狀動脈硬化的程度。

結果

兔子在餵食12周的膽固醇之後，每兩週自其耳朵抽血一次。餵食含有各種不同濃度的厚朴及澤瀉之膽固醇混合飼料的兔子，其血中膽固醇含量經由膽固醇酯化酵素和膽固醇氧化酵素的反應，在500nm的波長下測其呈色反應的吸光度，所得出之膽固醇含量經整理歸納及統計分析後，列於表一中。在餵食

12週1mg/kg的藥物混合飼料後，可以把餵食只含有1%膽固醇飼料的對照組的血中膽固醇自1750mg/dl降低至1320mg/dl，這一降低約爲24%，而10mg/kg的藥物混合飼料則可以降低血中膽固醇至832mg/dl，降低的比例約爲52%，而100mg/kg的藥物混合飼料則更可以降低血中膽固醇至702mg/dl，降低血脂的作用更高達60%，這些差距就統計學上的分析來講，均具有明顯的意義。

至於探討藥物混合飼料是否能改善血管硬化的現象，則是將餵食12週膽固醇飼料的兔子犧牲後，取出主動脈作Sudan IV染色，有粥狀動脈硬塊斑形成的血管，會被染成深灰的顏色。結果顯示只餵食膽固醇的兔子，其血管有明顯的粥狀動脈硬化形成，而沒有餵食膽固醇的兔子其主動脈則是表面光滑，沒有任何粥狀動脈硬塊的產生。圖一A顯示沒有餵食膽固醇的光滑血管表面，餵食膽固醇的白兔之主動脈則有相當嚴重之粥狀動脈硬塊產生(圖一B)，餵食含有0.10mg/kg(圖一C)及1mg/kg(圖一D)厚朴及澤瀉的膽固醇混合飼料並沒有明顯的改善動脈硬化的現象，而10mg/kg(圖一E)及100mg/kg(圖一F)的膽固醇混合飼料則明顯的縮小因長期餵食膽固醇所產生的粥狀動脈硬化面積。圖二所表示的柱狀圖是以數位影像分析處理軟體來定量粥狀動脈硬塊佔血管總面積的百分比。結果顯示，長時期餵食1%膽固醇的兔子，其粥狀動脈硬塊佔血管總面積約37%，而餵食10mg/kg及100mg/kg厚朴及澤瀉的膽固醇混合飼料12 週後，這一比值則分別降低至21%及7%。從這一實驗結果，我們可以觀察到厚朴及澤瀉的併同使用，對於血管粥狀動脈硬化的形成確實有其預防的作用。

討論

本篇計畫的主要目的，在於探討利用厚朴及澤瀉的混合製劑是否能有效的改善粥狀動脈硬化的形成。我們已知粥狀動脈硬化的形成主要是因爲過多的低密度脂蛋白被過度的氧化後(19)，造成泡沫細胞堆積在血管內皮下層細胞中。所以在篩選改善粥狀動脈硬化的中藥過程，找尋具有抗氧化或降血脂的藥物便成了一個相當重要的研究方向。藥物抗氧化的機轉有許多不同的路徑，包括直接清除自由基或是間接的活化自由基的代謝酵素，進而降低在心血管系統中的氧化作用。

在先前的實驗結果，我們觀察到厚朴的兩個主成份Honokiol和Magnolol都能有效的增加超氧歧化酵素的RNA表達，而這一作用是呈現與濃度有正相關性的作用。這一結果顯示具有抗氧化作用的厚朴極可能是藉由影響超氧歧化酵素的基因表達。

在上述的研究結果中，我們得知厚朴和澤瀉具有抗氧化及降血脂的作用。利用這些特性，我們便探討以這兩種中藥混入飼料中來餵食高血脂的兔子，是否能有效的降低粥狀動脈硬化的產生。在餵食12週的厚朴和澤瀉的高膽固醇混合飼料後，將主動脈取出做粥狀動脈硬化的染色，我們發現10mg/kg和100mg/kg的厚朴和澤瀉的高血脂混合飼料能明顯降低粥狀動脈硬化的產生。這一作用顯示抗氧化的厚朴和降血脂的澤瀉對於粥狀動脈硬化的形成具有預防的功效。

雖然我們在兔子體內觀察到厚朴和澤瀉能抑制粥狀動脈硬化的形成，並不表示在人體也能產生同樣的作用，畢竟人類和兔子的生理系統仍有相當程度的差距，能否應用到臨床上的心血管病人，仍需進一步的研究。然而藉由本實驗的結果，確能提供我們開發抗粥狀動脈硬化藥物的一個動物模式，這對於縮短應用到臨床的時程，將有相當程度的助益。

誌謝

本研究接受中國醫藥學院研究計畫（編號：CMC86-M-09）及行政院衛生署中醫藥委員會研究計畫（編號：CCMP88-RD-039）補助，謹此誌謝。

參考文獻

1. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. Am J Cardiol

1993, 71:9B-14B.

2. Cohen RA, Zitnay KM, Haudenschild CC, Cunningham LD. Loss of selective endothelial cell vasoactive functions caused by hypercholesterolemia in pig coronary arteries. Circ Res 1988, 63(5):903-10.

3. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. New Eng J Med 1986, 315(17):1046-51.

4. Andrews HE, Bruckdorfer KR, Dunn RC, Jacobs M. Low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. Nature 1987, 327(6119):237-9.

5. Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL. Van Hove CE, Coene MC, Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. Circ Res 1986, 58(4):552-64.

6. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. Nature 1990, 344 (6262):160-2.

7. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. J Clin Invest 1992, 90(4): 1248-53.

8. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. J Clin Invest 1992, 89(1):10-8.

9. Teng CM, Chen CC, Ko FN, Lee LG, Huang TF, Chen YP, Hsu HY. Two antiplatelet agents from Magnolia officinalis. Thromb Res 1988, 50 (6):757-65.

10. Chan P, Tsai SK, Chiang BN, Hong CY. Trilinolein reduces infarct size and suppresses ventricular arrhythmias in rats subjected to coronary ligation. Pharm 1995, 51(2):118-26.

11. Lo YC, Teng CM, Chen CF, Chen CC, Hong CY. Magnolol and honokiol isolated from Magnolia officinalis protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. Biochem Pharm 1994, 47(3):549-53.

12. Oury TD. Day BJ. Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. Free Rad Bio Med 1996, 20(7):957-65.

13. Santa Maria C, Ayala A, Revilla E. Changes in superoxide dismutase activity in liver and lung of old rats. Free Rad Res 1996, 25(5):401-5.

14. Liu TZ, Yang HL, Chan CP, Pan WL, Wu SK. Induction of superoxide dismutase isozymes by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide in cultured normal and hyperplastic gingival fibroblasts. J. Form Med Asso 1996, 95(3):236-40.

15. Chang HL, Wu CH, Chung JG, Lin WC, Chen GW, Lin JG. Antiatherogneic effect of Pou Yan Fan Wu Tan in hypercholesterolemic rat. J Chin Med 1998, 9 (1): 53-60.

16. Yoshikawa M, Fukuda Y, Hatakeyama S, Tanaka N, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N. Sulfoorientalols a, b, c, and d, four new biologically active sesquiterpenes from Alismatis rhizoma. Chem Pharmaceu Bull 1993, 41(6): 1194-6,.

17. Wagner J, Thiele F, Ganten D. Transgenic animal as models for human disease Clin Exper Hypertension 1995, 17(4):593-605.

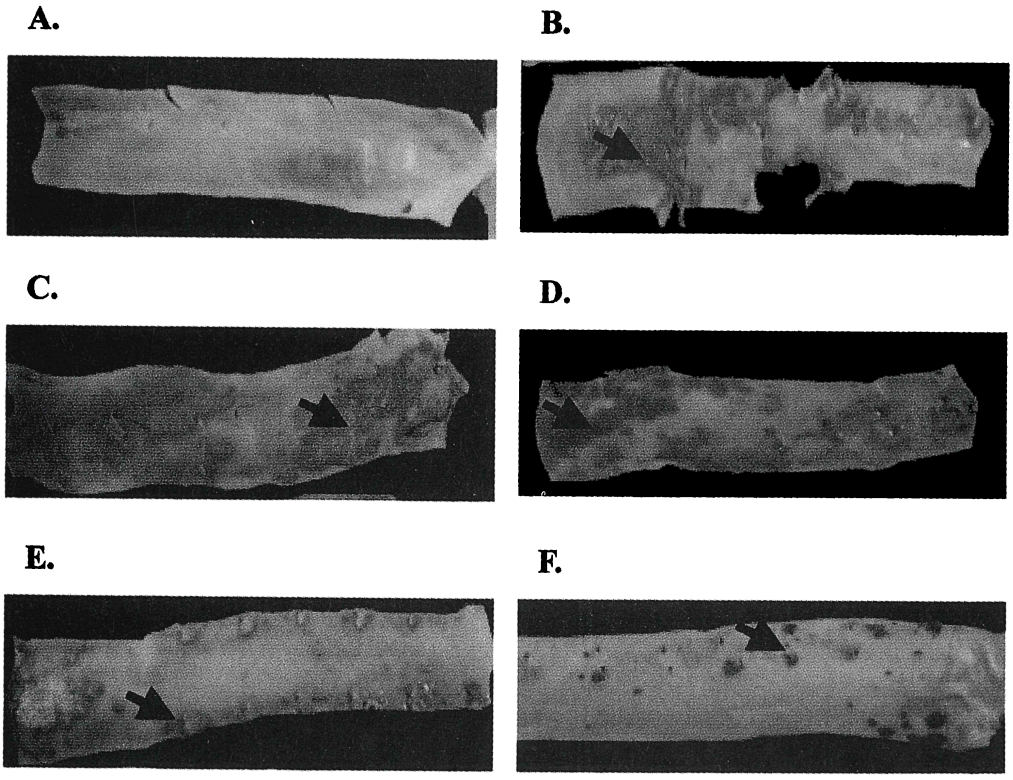
18. Hofmann SL, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL, Hammer RE. Overexpression of low density lipoprotein (LDL) receptor eliminates LDL from plasma in transgenic mice. Science 1988, 239(4845):1277-81.

19. Portoles MT, Ainaga MJ, Pagani R. The induction of lipid peroxidation by E. Coli lipopolysaccharide on rat hepatocytes as an important factor in the etiology of endotoxic liver damage. Biochim Biophys Acta 1993, 1158:287-92.

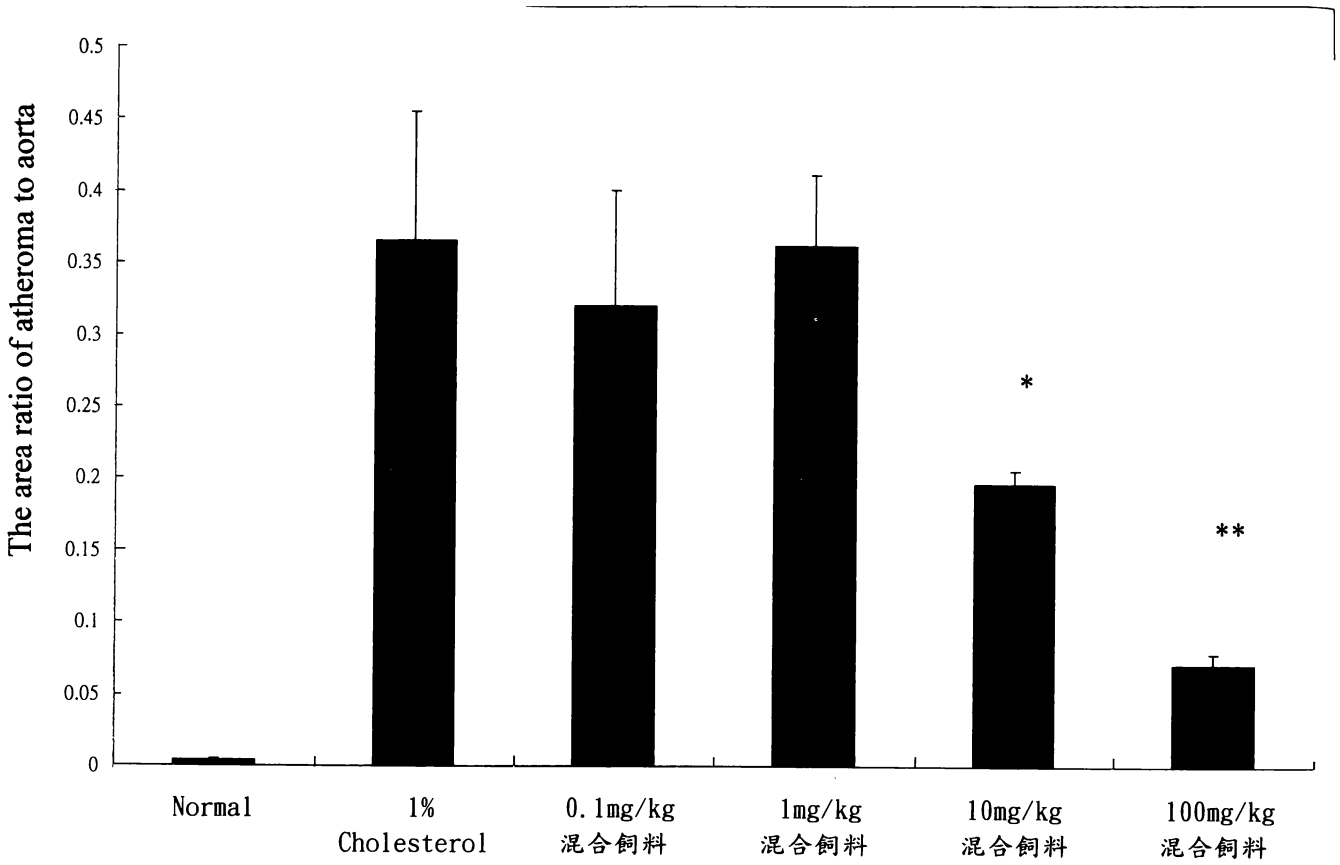
表一，餵食12周膽固醇的兔子，在不同藥物處理之後其血中總膽固醇含量的比較，*表示和1%膽固醇組的比較， p value <0.05; ** 表示p value <0.01 ， n=10 。

血中總膽固醇含量 (mg/dl)

正常飼料組	86 ± 18
1%膽固醇組	1750 ± 365
0.10mg/kg厚朴及澤瀉	1689 ± 253
1mg/kg厚朴及澤瀉	1320 ± 316*
10mg/kg厚朴及澤瀉	832 ± 192**
100mg/kg厚朴及澤瀉	702 ± 201**



圖一、厚朴及澤瀉的膽固醇混合飼料對於粥狀動脈的改善作用。A: 沒有餵食高膽固醇的兔子主動脈；B: 餵食高膽固醇的兔子主動脈，深黑色代表產生粥狀動脈硬塊斑的部位(箭頭所指處)；C: 餵食0.1mg/kg厚朴及澤瀉的膽固醇混合飼料的兔子主動脈；D: 餵食1mg/kg的膽固醇混合飼料的主動脈；E: 餵食10mg/kg混合飼料的主動脈；F: 餵食100mg/kg混合飼料的主動脈。



圖二、含有厚朴和澤瀉的高膽固醇混合飼料對於改善粥狀動脈硬化形成的作用。除了正常組的兔子外，各組均餵食12週的 1 %膽固醇飼料，其中四組的飼料分別添加0.1mg/kg，10mg/kg，100mg/kg，的厚朴和澤瀉。圖中數據代表以數位影像分析處理軟體所定量之粥狀動脈硬塊佔血塊總面積的百分比。結果顯示10mg/kg，100mg/kg的厚朴和澤瀉能有效的降低粥狀動脈硬塊的形成。*p <0.05，**p <0.01，n=10。

The antiatherogenic effects of Magnolia Officanalis and Alismatis Rhizoma

Chieh-Hsi Wu[1], Wen-Ling Dai[1], Huei-Yann Tsai[1], Ming-Tsuen Hsieh[2] and Weng-Cheng Chang[3]

[1]*Department of Pharmacology,* [3]*Department of Physiology, School of Medicine,*
[2]*Institute of Chinese Pharmacy, China Medical College, Taichung, Taiwan, Republic of China*

Atherosclerosis has been known to be a key injury to elicit cardiovascular diseases. Two Chinese medicine, *Magnolia Officinalis* and *Alismatis Rhizoma*, have been regarded as an antioxidant and a lipid lowering agent, respectively. We therefore aimed in this study to elucidate the roles of these drugs in protecting atherosclerosis. Sixty New Zealand white rabbits were fed with 1% cholesterol diets for 12 weeks with or without addition of 1:1 *Magnolia Officinalis* and *Alismatis Rhizoma* to evaluate if these two compounds can inhibit atheorma formation. Ten mg/kg and 100mg/kg of *Magnolia Officinalis/Alismatis Rhizoma* mixtures were shown to significantly reduce atherosclerotic lesions on rabbit aorta. Based on these results, we believe that these Chinese medicine can be effective in preventing atherosclerosis formation. Further evaluation for the clinical application of these medicines on human subjects may benefit those suffering from cardiovascular disease.

Key Words: atherosclerosis, Honokiol, Magnolol, *Alismatis Rhizoma*